

## 临床研究

## 精神分裂症患者丝氨酸消旋酶和D构象氨基酸氧化酶的生物信息学与功能分析

平军娇<sup>1</sup>, 高永双<sup>1</sup>, 吴勇<sup>1</sup>, 杜宝国<sup>1</sup>, 蒋廷云<sup>1</sup>, 钱刚<sup>2</sup><sup>1</sup>中山市第三人民医院, 广东 中山 528400; <sup>2</sup>遵义医学院, 贵州 遵义 563000

**摘要:**目的 D-ser作为一种重要的神经胶质细胞递质, 其合成与代谢依赖于丝氨酸消旋酶(SR)和D构象氨基酸氧化酶(DAO), SR及DAO基因与精神分裂症密切相关, 本研究目的为阐明精神分裂症患者SR及DAO结构与功能的关系。方法 从精神分裂症血液中克隆到SR及DAO基因, 对其进行生物信息学分析。结果 序列分析结果表明, SR及DAO基因分别编码340个和347个氨基酸的多肽, 与健康人、猿、猴的同源性在96%以上; 预测SR及DAO蛋白质的相对分子质量分别为36.57 KDa和39.47 KDa, 理论等电点分别为6.11和6.36。亚细胞定位分析结果发现, SR蛋白主要定位于细胞的线粒体中, DAO蛋白主要定位于线粒体和过氧化物酶体中, 提示这两种蛋白在细胞中主要发挥合成与代谢作用。结构与功能分析发现, SR蛋白有1个结构域, DAO蛋白含有2个结构域和一个链接区。结论 推测SR及DAO在真核细胞的蛋白质合成与代谢等过程中发挥重要功能。  
**关键词:**精神分裂症; 丝氨酸消旋酶; D构象氨基酸氧化酶; 结构预测; 序列分析

## Bioinformatics and function of SR and DAO in schizophrenia

PING Junjiao<sup>1</sup>, GAO Yongshuang<sup>1</sup>, WU Yong<sup>1</sup>, DU Baoguo<sup>1</sup>, JIANG Tingyun<sup>1</sup>, QIAN Gang<sup>2</sup><sup>1</sup>Zhongshan Third People's hospital, Zhongshan 528400, China; <sup>2</sup>Department of Cell Biology and Genetics, Zunyi Medical College, Zunyi 563099, China

**Abstract: Objective** To explore the relationship between structure and function of SR and DAO in schizophrenia. **Methods** SR and DAO gene were cloned from blood of patients with schizophrenia with bioinformatics analysis. **Results** The SR and DAO genes encoded 340 and 347 amino acids, respectively. It had more than 96% homology with healthy humans, apes and monkeys. The relative molecular mass of SR and DAO proteins were predicted to be 36.57 KDa and 39.47 KDa, respectively. The isoelectric point were 6.11 and 6.36. SR distribution was involved in chondriosome. DAO distribution was involved in chondriosome and peroxysome. It indicated that SR and DAO played a mayor role in synthesis and metabolism of cells. Three-dimensional measurement revealed that SR protein was composed of a structural domains and DAO protein was composed of two structural domains and one link region. **Conclusion** SR and DAO can promote protein synthesis and metabolism in eukaryotic cells.

**Keyword:** schizophrenia; SR; DAO; structure prediction; sequence analysis

遗传学研究发现, 精神分裂症发病机制是体内多个致病基因蓄积的结果<sup>[1]</sup>。随着分子生物学的发展, 越来越多的研究证实精神分裂症患者存在基因方面的异常, 包括多巴胺D2及D3受体基因、reelin基因、GluR6基因、MTHFR基因、NRG1基因和bdnf基因等。

在哺乳动物中存在D型丝氨酸(D-ser)<sup>[2]</sup>, 后来研究发现包括人类在内的哺乳动物在中枢神经系统存在区域性的高浓度D-ser<sup>[3-5]</sup>。研究表明D-ser具有比甘氨酸更强的激活效能<sup>[6]</sup>。丝氨酸消旋酶(SR)能够专一性催化L-ser转化为D-ser; DAO存在于哺乳动物中枢神经系统和周围组织中, 发挥着促进中性D-

ser氧化去氨基的作用, 这种酶在D-ser的代谢过程中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。与正常人相比精神分裂症、重度抑郁和双相精神障碍患者额叶皮质和海马区域的SR分别减少39%和21%, 在额叶皮质DAO并无变化, 而在海马DAO蛋白明显增加<sup>[9]</sup>。精神分裂症患者脑脊液D-ser水平是降低的。

Miranda等<sup>[4]</sup>首次在正常人血液中分离到了SR基因, 研究发现SR基因变异与精神分裂症具有相关性<sup>[10]</sup>, 随后也发现SR基因与精神分裂症密切相关<sup>[11-14]</sup>。西安地区DAO基因的多态性与精神分裂症具有相关性<sup>[15]</sup>。在日本人群对340名正常人和340名精神分裂症患者采用病例对照研究, 结果发现DAO单体型与精神分裂症存在关联性<sup>[16]</sup>。在爱尔兰人群中的研究也发现DAO基因与精神分裂症密切相关<sup>[17]</sup>。有关D-ser的合成与代谢、在中枢神经系统的分布及存储

收稿日期: 2017-05-12

基金项目: 广东省中山市科技计划项目(2014A1FC070)

作者简介: 平军娇, 硕士研究生, 主管检验师, E-mail: pingjunjiao@126.com

释放机制国内外已有较多报道,而基因是决定性状的内在因素,目前对于SR和DAO的研究停留在基因序列水平上,由基因上升至蛋白三维结构的性质在国内鲜见报道。三维结构详细信息的缺失,会阻碍对该蛋白的功能、催化机理等的进一步研究。使用同源建模和分子动力学模拟的方法能很好地应用于生物大分子的理论模拟,并指导实验现象<sup>[18]</sup>。因此,本研究克隆出SR及DAO基因,通过利用生物信息学对SR及DAO蛋白质的结构与性质进行分析,深入了解SR及DAO在精神分裂症中所发挥的功能,为抗精神病药物的研发提供分子水平的理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集中山市第三人民医院门诊就诊或住院部住院,祖籍中山地区的精神分裂症患者入组,入组标准:18~59周岁;性别不限;小学以上文化程度;有足够的视听水平完成研究所需的检查;符合美国精神病诊断标准第4版(DSM-IV)精神分裂症的诊断标准;病程小于5年;PANSS量表阳性和阴性症状总分评分 $\geq 60$ 分;通过一般体格检查、神经系统检查和精神检查;排除标准:现患有严重器质性疾病者、服用精神活性物质者、大量吸烟或饮酒者以及孕妇和哺乳期妇女,排除器质性精神障碍、癫痫所致精神障碍、抑郁症、双相障碍、特应性皮炎、脑卒中、阿尔茨海默病及肿瘤患者;自愿参加本研究并签署知情同意书。所有入组对象由我院2名主治级别以上医师共同诊断,对诊断不确定者不予纳入。

### 1.2 方法

1.2.1 血样采集 采集精神分裂症患者早晨空腹外周静脉血5 mL以0.5 mol/L的EDTA (pH 8.0) 100  $\mu$ L抗凝, -20  $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.2.2 提取基因组DNA 解冻血样,用全基因组DNA提取试剂盒(OMEGA D3392-01)提取基因组DNA,并用紫外分光光度计及1%琼脂糖凝胶电泳检测提取质量。

1.2.3 引物设计及特定基因片段扩增 在NCBI网上人类基因库中对SR及DAO基因进行检测找到基因序列,使用Primer 5.0软件设计引物。总反应体系为20  $\mu$ L,其中包括Taq DNA聚合酶0.2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.0  $\mu$ L, 25 mmol/L的dNTP 0.2  $\mu$ L, Primer(10  $\mu$ mol/L)各0.5  $\mu$ L, 模板DNA 1.0  $\mu$ L, 双蒸水补足至20  $\mu$ L。PCR扩增条件为:95  $^{\circ}$ C预处理5 min, 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 55  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min,最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR反应在ABI9700 PCR仪上进行。

1.2.4 PCR产物测序 用试剂盒(OMEGA D2500-01)

回收PCR扩增目的条带,定量后进行测序,测序反应体系为:2  $\mu$ L Mix(Bigdy3.1、5 $\times$ sequencing buffer、H<sub>2</sub>O), 2  $\mu$ L纯化后的PCR产物, 1  $\mu$ L引物(5 mmol/L)。测序反应在ABI9700 PCR扩增仪上进行。循环条件为:96  $^{\circ}$ C 2 min后进行30个(95  $^{\circ}$ C 10 s, 50  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 4 min)循环反应。测序反应结束后将得到的PCR产物用试剂盒(OMEGA 1320-01)进行纯化,在遗传分析仪ABI3730xl进行测序,得到的序列进行Blast比对,确定所扩增序列为目的序列。

1.2.5 序列的生物信息学分析 采用NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))在线分析工具BLAST对GenBank的非冗余核酸数据库和非冗余蛋白质数据库序列进行比对分析;采用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线分析工具ORF finder预测开放阅读框;利用Expasy的ProtParam程序统计SR及DAO蛋白中氨基酸含量、理论相对分子质量及等电点;应用ProtScale程序对蛋白质的疏水性进行分析;通过在线工具GOR4对SR和DAO进行二级结构分析;蛋白质信号肽预测采用(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线工具;蛋白质亚细胞定位预测采用哈佛大学网上在线工具进行预测;蛋白质的结构功能域用SMART服务器和InterProScan软件进行预测;采用Profun在线工具预测精神分裂症患者SR及DAO蛋白的功能分类;采用同源模型服务软件SWISS-MODEL<sup>[9, 10]</sup>预测SR及DAO的三维结构。

## 2 结果

### 2.1 SR及DAO氨基酸序列分析

通过克隆基因测序获得精神分裂症患者SR及DAO基因的全长DNA序列,去除载体、内含子及冗余序列后通过ORF finder对目的序列进行分析,结果表明SR及DAO基因序列全长分别为1023 bp和1044 bp,分别包含一个完整的读码框,SR编码含340个氨基酸残基的多肽,DAO编码含347个氨基酸残基的多肽,通过NCBI Blast比对发现两种多肽的氨基酸序列与猿类、猴类、绒类、牛、马及猫等具有高度同源性,同源性为85%以上。

### 2.2 SR及DAO理化性质分析

利用expasy中的protparam在线软件对精神分裂症患者SR及DAO基因所编码的340个氨基酸和347个氨基酸序列进行分析,预测结果为:SR及DAO蛋白的相对分子质量分别为36.57 kDa和39.47 kDa;理论等电点pI分别为6.11和6.36;原子组成为C<sub>1630</sub>H<sub>2632</sub>N<sub>434</sub>O<sub>490</sub>S<sub>13</sub>和C<sub>1787</sub>H<sub>2743</sub>N<sub>491</sub>O<sub>503</sub>S<sub>10</sub>。

SR蛋白的负电荷残基(Asp+Glu)34个,正电荷残基(Arg+Lys)31个;不稳定系数(Instability index)为

32.55, 表明SR蛋白状态稳定; DAO蛋白的负电荷残基(Asp+Glu)38个, 正电荷残基(Arg+Lys)34个; 不稳定系数(Instability index)为31.68, 表明DAO蛋白状态稳定;

SR蛋白的疏水性分析结果表明, 其疏水性最大值为4.200, 说明该处的疏水性在该多肽中最强, 疏水峰值大于0的氨基酸占35%; 亲水峰最大值为-3.800,

整个蛋白质表现出高度的亲水性, 亲水性评估为-8.99 (图1A)。

DAO蛋白的疏水性分析结果表明, 其疏水性最大值为4.500, 说明该处的疏水性在该多肽中最强, 疏水峰值大于0的氨基酸占35%; 亲水峰最大值为-4.500, 表现出高度的亲水性, 亲水性评估为-17.29 (图1B)。

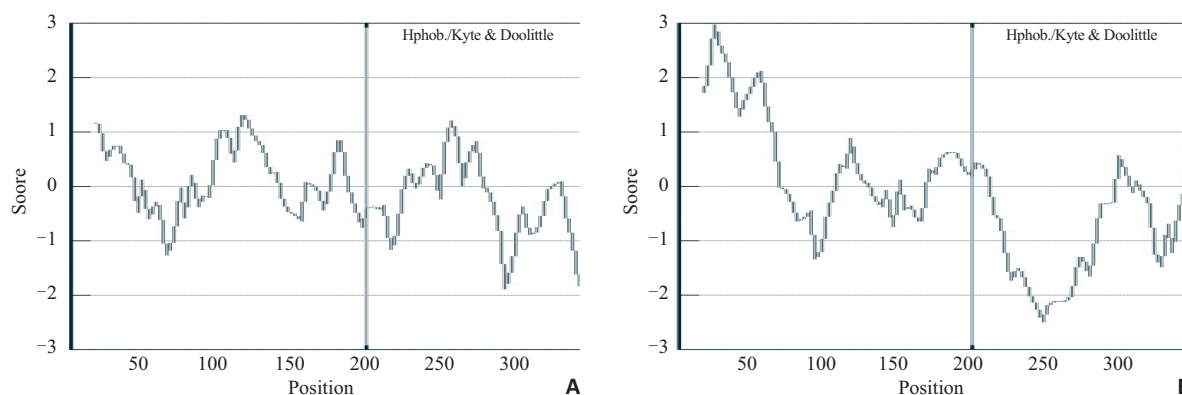


图1 SR及DAO蛋白质疏水性分析结果

A: SR蛋白疏水性分析结果; B: DAO蛋白疏水性分析结果。

### 2.3 二级结构预测

采用GOR4方法对精神分裂症患者的SR蛋白及DAO蛋白进行二级结构分析, 结果如图2所示, 精神分裂症患者SR蛋白的二级结构中有32.06%为螺旋结

构(Helices), 线状结构(Extended strand)和卷曲结构(Random coil)分别为17.65%和50.29%, 螺旋结构和无规则卷曲是该蛋白质二级结构的主要组成部分。

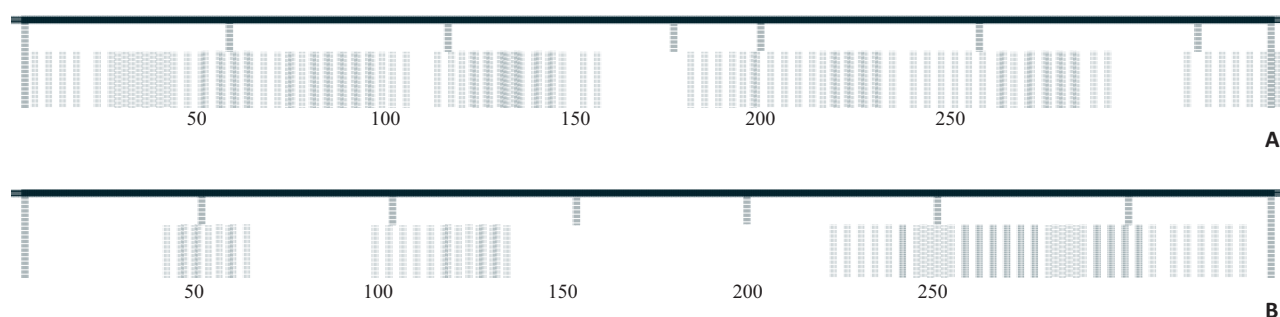


图2 SR蛋白与DAO蛋白的二级结果预测

横轴表示氨基酸位置; 蓝色表示 $\alpha$ -螺旋; 红色表示无规则卷曲; A: SR蛋白的二级结果预测; B: DAO蛋白的二级结果预测。

DAO蛋白的二级结构中有20.17%为螺旋结构(Helices), 线状结构(Extended strand)和卷曲结构(Random coil)分别为22.19%和57.64%。由此表明, 线状结构和无规则卷曲是该蛋白质二级结构的主要组成部分。

### 2.4 亚细胞定位及信号肽预测

通过在线工具PSORT对精神分裂症患者SR蛋白和DAO蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示SR蛋白和DAO蛋白主要定位于细胞的过氧化物酶体和线粒体中。

利用<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>网站对精神分裂症患者SR蛋白及DAO蛋白的信号肽进行预测, 结果显示SR蛋白不含有信号肽, DAO蛋白在

第16位和17位氨基酸具有最高综合剪切位点, 分值为0.749, 由此推断, SR无跨膜结构和信号肽, DAO含有信号肽序列。

### 2.5 结构域、高级结构分析及其功能预测

采用在线软件interpro进行蛋白质结构域初级预测, 结果显示SR蛋白只含有一个细胞氨基酸代谢过程的结构域, DAO蛋白含有两个结构域和一个连接区, 分别为D氨基酸代谢过程、氧化还原过程和一个FAD连接区。

精神分裂症患者SR和DAO蛋白功能通过CBS在线Profun软件进行序列分析, 其功能分类如表1和表2所示, SR蛋白具有氨基酸生物合成、脂肪酸代谢、转化、辅酶因子的生物合成、能量代谢、中间产物代谢



的概率分别为10.174、5.397、3.438、3.203、2.866、1.520, 酶蛋白和膜蛋白预测值为2.248和0.499, 表明该蛋白为酶蛋白, 在酶类分级中, 异构酶和裂解酶的可能性最大, 为1.711和1.549。

表 1 SR蛋白功能预测结果

功能分类	产物	概率
氨基酸生物合成	0.224	10.174
脂肪酸代谢	0.070	5.397
转化	0.151	3.438
辅酶因子的生物合成	0.231	3.203
能量代谢	0.258	2.866
中间产物代谢	0.096	1.520

表 2 DAO蛋白功能预测结果

功能分类	产物	概率
氨基酸生物合成	0.185	8.432
细胞膜	0.333	5.466
中间产物代谢	0.341	5.407
辅酶因子的生物合成	0.273	3.789
能量代谢	0.317	3.525
脂肪酸代谢	0.026	2.004

DAO蛋白具有氨基酸生物合成、细胞膜、中间产物代谢、脂肪酸代谢、辅酶因子的生物合成、能量代谢的概率分别为8.432、5.466、5.407、3.789和3.525, 酶蛋白和膜蛋白预测值为2.787和0.283, 表明该蛋白为酶蛋白, 在酶类分级中, 裂解酶和氧化还原酶的可能性最大, 为1.640和0.964。

采用同源模型服务软件SWISS-MODEL预测精神分裂症患者的SR及DAO蛋白三维结构, 如图3所示, SR蛋白包含一个结构域, DAO蛋白包含两个结构域及一个连接区。无规则卷曲是构成SR蛋白和DAO蛋白的主要结构, 图3也能看出无规则卷曲占据了较大面积。

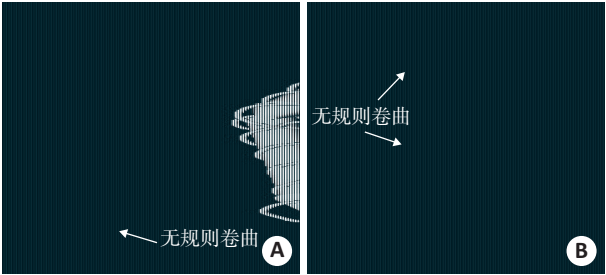


图3 SR和DAO蛋白的三维结构模型  
A: SR蛋白的螺旋状结构模型; B: DAO蛋白的螺旋状结构模型。

3 讨论

精神分裂症是一种多基因遗传疾病, 其发生发展可能有多基因和多因素共同起作用, 在不同的家系中可能有不同的易感性位点<sup>[19]</sup>。大量研究表明D型丝氨酸具有比甘氨酸更强的激活效能, 由于NMDA受体机能障碍被认为是精神分裂症发生的病理生理因素, 所以最近有大量研究转移到D型丝氨酸方面, 研究发现D型丝氨酸的水平异常或者参与D型丝氨酸合成代谢的酶基因异常均与精神分裂症有关<sup>[7]</sup>。D型丝氨酸的合成与代谢依赖于SR和DAO, 本研究通过克隆有精神分裂症家族史的精神分裂症患者发现, 患者的SR和DAO基因与健康人的SR和DAO基因同源率为100%, 表明这两个基因是否异常不是引起精神分裂症的直接因素。在2014年精神基因组学联盟精神分裂症工作小组通过对15万名志愿者的基因组进行分析, 通过目前成熟的先进技术发现在人类基因组中, 有108遗传区域与精神分裂症有关<sup>[20]</sup>, 而这108个遗传区域里不含有SR和DAO基因, 这与本研究结果一致。

亚细胞定位的分析结果表明, 精神分裂症患者的SR和DAO蛋白主要定位于细胞的线粒体和过氧化物酶体中, 线粒体是能量转化、三羧酸循环和氧化磷酸化的场所, 这也正符合SR和DAO发挥消旋酶和氧化酶作用的特征。结构域预测结果显示, SR蛋白包含1个高度保守的结构域, DAO蛋白包含2个高度保守的结构域及一个连接区, 氨基酸多序列比对结果发现存在SR和DAO蛋白为两个高度保守的序列, 这在不同物种之间的同源性较高, 推测不同物种之间SR和DAO发挥的功能是一致的。

在蛋白质二级结构预测中, SR和DAO蛋白的结构中无规则卷曲占的比例较大, 分别为50.29%和57.64%, 无规则卷曲受侧链相互作用影响较大, 经常构成酶活性部位和其他蛋白质特异功能部位的中央环, 发挥重要作用, 推测此部位是SR和DAO蛋白发挥丝氨酸消旋酶和氧化酶的重要部位。

精神分裂症是一种严重的精神疾病, 对个人、家庭及社会的危害性极大。基因是影响疾病发生的内在因素, 目前对精神分裂症易感基因的研究较多, 但对于精神分裂症SR及DAO氨基酸突变位点及蛋白质结构与功能性质的研究少见报道, 因此由基因上升到结构蛋白的性质研究为明确精神分裂症SR及DAO的性质与突变位点显的尤为重要。

本课题通过生物信息学软件对SR及DAO进行分析并构建三维结构, 深入了解SR及DAO在精神分裂症中所发挥的功能, 为抗精神病药物的研发提供分子水平的理论依据。

chinaXiv:201712.00044v1

## 参考文献:

- [1] O'donovan MC, Craddock N, Norton NA, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(9): 1053-5.
- [2] Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, et al. The presence of free D-serine in rat brain[J]. *FEBS Lett*, 1992, 296(1): 33-6.
- [3] Burnet PW, Hutchinson L, von Hesling M, et al. Expression of D-serine and glycine transporters in the prefrontal cortex and cerebellum in schizophrenia[J]. *Schizophr Res*, 2008, 102(1/3): 283-94.
- [4] de Miranda J, Santoro A, Engelender S, et al. Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis[J]. *Gene*, 2000, 256(1/2): 183-8.
- [5] Mustafa AK, Kumar M, Selvakumar B, et al. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(8): 2950-5.
- [6] 阳洪波, 袁建刚, 彭小忠. D-丝氨酸在中枢神经系统中的功能研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(6): 852-4.
- [7] Billard JM. D-serine signalling as a prominent determinant of neuronal-glial dialogue in the healthy and diseased brain[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5B): 1872-84.
- [8] Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, et al. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide[J]. *J Neuroinflammation*, 2004, 1(1): 1-11.
- [9] Nadri C, Amar S, Bendikov I, et al. A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 9(1): S222-3.
- [10] Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, et al. A genetic variant of the serine racemase gene is associated with schizophrenia[J]. *Biol Psychiatry*, 2007, 61(10): 1200-3.
- [11] Balu DT, Li Y, Puhl MD, et al. Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(26): E2400-9.
- [12] Balu DT, Basu AC, Corradi JP, et al. The NMDA receptor co-agonists, D-serine and glycine, regulate neuronal dendritic architecture in the somatosensory cortex[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(2): 671-82.
- [13] Devito LM, Balu DT, Kanter BR, et al. Serine racemase deletion disrupts memory for order and alters cortical dendritic morphology[J]. *Genes Brain Behav*, 2011, 10(2): 210-22.
- [14] Labrie V, Fukumura R, Rastogi A, et al. Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(17): 3227-43.
- [15] 李悦, 陈元堂, 胡江, 等. D-氨基酸氧化酶基因多态性与精神分裂症的关联研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(9): 2142-4, 2147.
- [16] Ohnuma T, Shibata N, Maeshima H, et al. Association analysis of glycine- and serine-related genes in a Japanese population of patients with schizophrenia[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(3): 511-8.
- [17] Corvin A, McGhee KA, Murphy K, et al. Evidence for association and epistasis at the DAOA/G30 and D-amino acid oxidase loci in an Irish schizophrenia sample[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144B(7): 949-53.
- [18] 胡建平, 柯国涛, 常珊, 等. HIV-1病毒DNA与整合酶结合后的构象变化[J]. *物理化学学报*, 2008, 24(10): 1803-10.
- [19] 陈元堂, 高成阁.  $\alpha$ 7-烟碱样乙酰胆碱受体基因多态性与精神分裂症的关联研究[J]. *四川精神卫生*, 2008, 21(1): 1-4.
- [20] Schizophrenia working group of the psychiatric genomics consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci[J]. *Nature*, 2014, 23(511): 421-7.